

<目的>

慶應義塾大学・岡野 栄之グループが推進する『iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷・脳梗塞の再生医療』を側面から支援し、臨床応用への研究開発工程を効率化・短縮化させることを目標とする。当該グループの分担業務として、iPS細胞由来神経前駆細胞の造腫瘍試験、特に移植後の長期経過観察（1年以上）とSorting後の造腫瘍性（+）細胞と（-）細胞のスパイクテストを評価する。

<試験概要>

iPS 細胞由来神経前駆細胞の造腫瘍性試験として、重篤免疫不全動物である NOG マウスの脳-線条体に被験細胞を投与する試験系について検討する。平成 25 年度は移植における基礎的な基盤形成を目的とする。まずは、脳-線条体移植に要する物品確保と技術習得を図った。次に、造腫瘍性を有する陽性対照として U251 細胞（アストロサイトマ: JCRB 細胞バンク）を用いて移植部位における感度を評価する。具体的には、U251 細胞 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ 個を NOG マウスの線条体に移植し、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月観察する。U251 細胞の移植は既に完了しており、今後経過観察をしていく。線条体移植の試験系では、明らかな脳肥大化が起きる場合を除き、腫瘍形成の有無を確認するために、脳を摘出したあとに組織切片の観察を行う必要がある。そのため、表 1 で示す観察期間の経過後、剖検を実施し造腫瘍性を評価する。

<試験方法>

NOG マウスの脳-線条体造腫瘍性感度検討試験

移植細胞: U251 細胞

移植マウス: NOG (NOD/Shi-scid,IL-2R^{null}) 主に 9 週齢

移植経路: 両側線条体

移植細胞数: $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$

観察期間: 3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月

造腫瘍性を有する細胞として U251 細胞（図 1）を使用し、NOG マウスに線条体投与(Bregma より前方 1 mm, 側方 2 mm の箇所; 図 2)した。U251 細胞を 1×10^5 個 NOG 線条体に移植すると、およそ 6 - 7 週間時点で明らかな脳肥大が観察される。その例を図 3、組織切片を図 4 に示した。移植細胞を同定するためにヒト細胞特異的抗体である抗 Lamin-A 抗体を用いて染色を行った。その結果、移植細胞が移植部位（線条体近辺）から上方に増殖していることが確認された。

<今後の予定>

iPS細胞由来神経前駆細胞の製造工程が決定すれば、それを被験細胞として造腫瘍試験を開始する。製造工程ではセルソーティング (FACS: Fluorescence-activated cell sorting)による選別を行う予定であり、選別後の造腫瘍性（+）細胞と（-）細胞のスパイクテストも併せて評価する。被験細胞は 1×10^6 個をNOGマウスの線条体に移植し、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、15ヶ月 観察する。また移植細胞に関して、その細胞集団としての基本情報を取得する（キャラクタライゼーション）。具体的には、FACS、

抗体染色、定量的RT-PCR等の方法を用いる。

表 1. U251 細胞の NOG 線条体造腫瘍感度検討試験

被験物	移植日	剖検期間	細胞数	NOG マウス数
U251 細胞	2014 年 2 月下旬 ~ 2014 年 3 月上旬	6 週間	10^5	3
		3 ヶ月	10^4	2
			10^3	2
			10^2	2
		6 ヶ月	10^3	6
			10^2	6
			10^1	6
		12 ヶ月	10^3	3
			10^2	3
			10^1	3

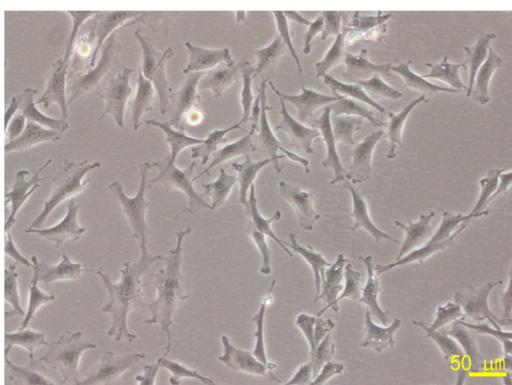


図 1. 造腫瘍感度検定試験における U251 細胞の位相差顕微鏡像



图 2. 线条体移植



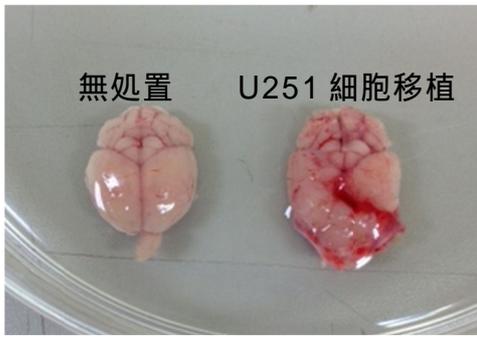
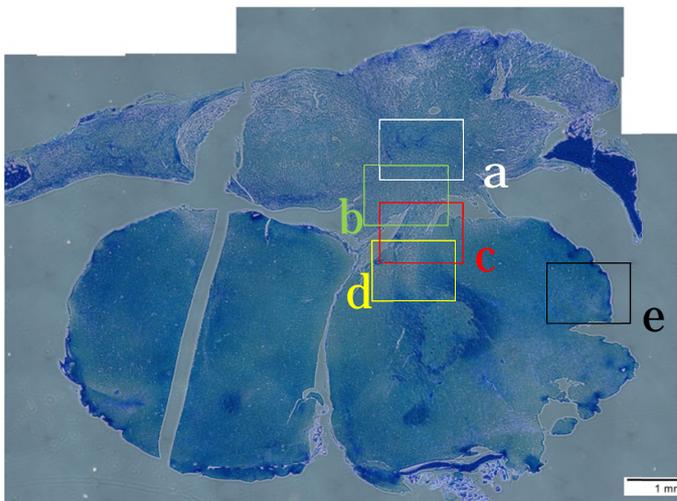
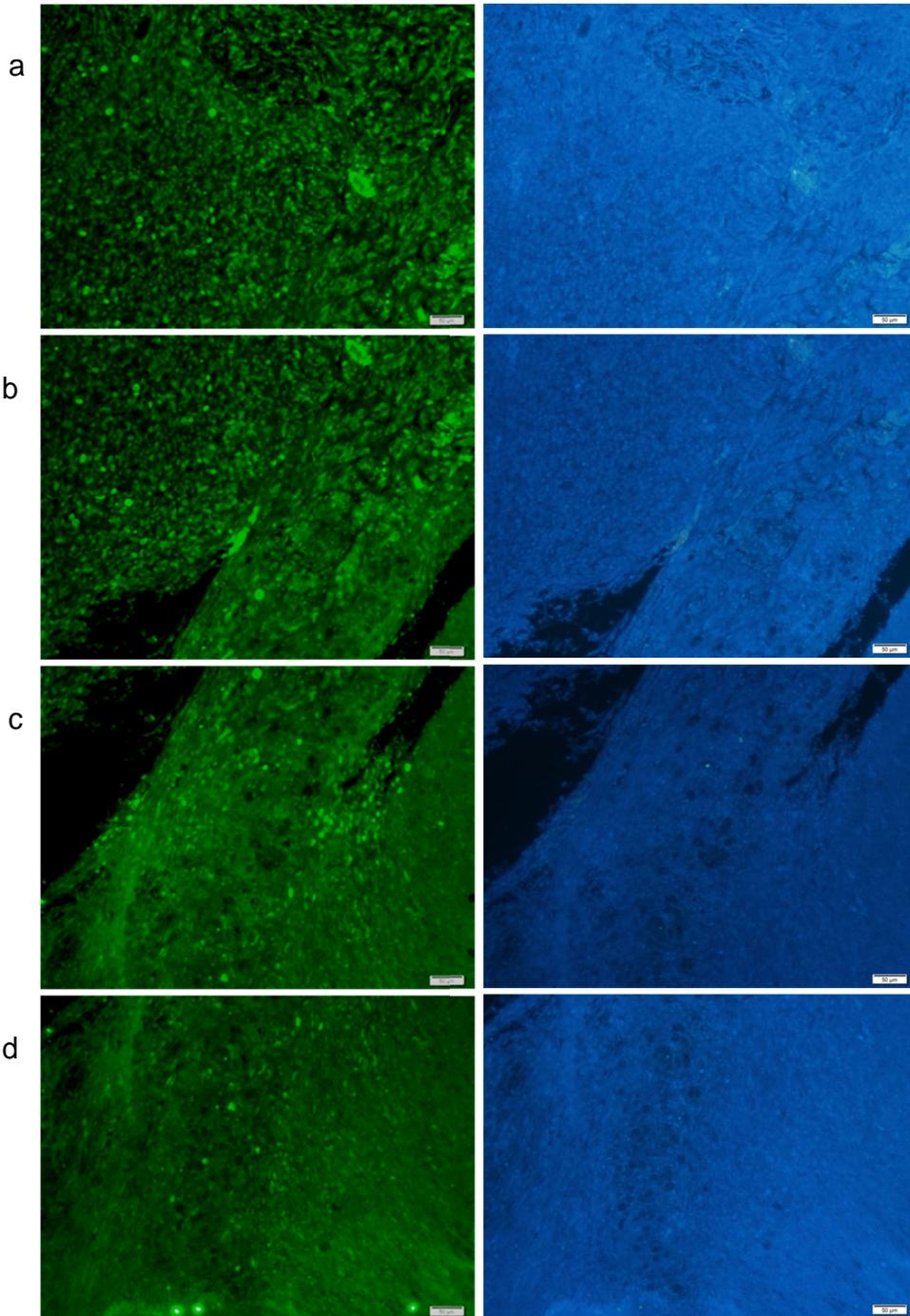


図 3. (上)左側マウス:細胞無し(コントロール)、右側マウス:U251 細胞移植
(中)U251 細胞移植部位肥大化、
(下)摘出脳 左側:細胞無(コントロール)、右側:U251 細胞移植





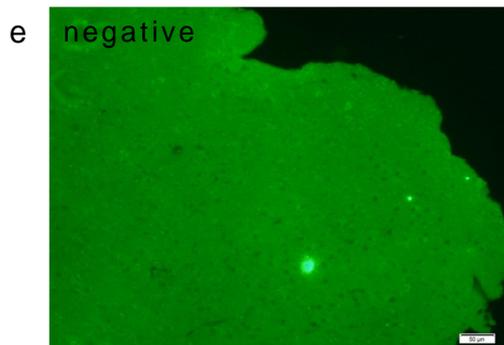


図 4. (上)クリューバー・バレラ染色 (a - e)長
方形で囲んだ領域は下図に相当する。
(下)(a - e) ヒト細胞特異的抗体(抗 Lamin 抗
体)